

HISTOLOGI DORSAL HORN DARI SPINAL CORD MENCIT YANG MENGALAMI NYERI INFLAMASI AKIBAT INDUKSI CFA (COMPLETED FREUD'S ADJUVANT) SETELAH PEMBERIAN GABAPENTIN DAN BACLOFEN

Fifteen Aprila Fajrin^{1*}, Junaidi Khotib², Imam Susilo³

¹Bagian Farmasi Klinik dan Komunitas Fakultas Farmasi Universitas Jember

²Departemen Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

³Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

*Email : fiezz_15@yahoo.co.id

DORSAL HORN HISTOLOGY OF SPINAL CORD FROM MICE WITH CFA (COMPLETED FREUD'S ADJUVANT) INDUCED INFLAMMATORY PAIN AFTER GABAPENTIN AND BACLOFEN ADMINISTRATION

Abstract

Pain is a multidimensional experience, generally most of chronic disease followed by pain incidence. Chronic pain can be caused by inflammation or neuropathic condition and change the imbalance of N-methyl-D-aspartate receptor 2B (NR2B) subunit. This research was an observation of the influence of gabapentin and baclofen to dorsal horn histology in inflammatory-induced chronic pain. Fourty mice Balb-C strain were divided into 8 groups i.e sham, negative control, gabapentin at three different doses (10, 30, 100 nmol) and baclofen at three different doses (1, 10, 30 nmol). Inflammatory condition was induced by intraplantar injection of CFA (Completed Freud's Adjuvant). Gabapentin and baclofen were given intrathecally once a day for seven consecutive days, at a week after CFA injection. Latency time toward thermal stimulus was measured on days 0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12 and 14 after CFA injection. Paw thickness at the ipsilateral site was also measured on days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 and 14 after CFA injection. Histology of the dorsal horn of spinal cord tissue was examined by haematoxylline-eosin staining. The result showed that intrathecal injection gabapentin and baclofen significantly increased latency time of mice toward thermal stimulus compared to negative control. Whereas gabapentin and baclofen administration could decrease inflammatory cell, vasodilatation and increase neuron forming of the dorsal horn histology compare to negative control. The conclusion of this research was gabapentin and baclofen administration had antinociceptic effect by increased latency time toward thermal stimulus and recoved histology of dorsal horn from mice with inflammatory pain

Keywords : *Inflammation, CFA, Gabapentin, Baclofen, Dorsal horn.*

Abstrak

Nyeri merupakan pengalaman yang multidimensional. Umumnya kebanyakan penyakit kronik selalu disertai dengan nyeri. Nyeri kronik dapat disebabkan oleh

Submit : 18-04-2013 Review : 07-06-2013 Review : 07-06-2013 revisi : 01-07-2013

inflamasi maupun neuropati dengan patofisiologi yang berhubungan dengan aktivitas reseptor *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) subunit 2B (NR2B). Sampai saat ini pengobatan nyeri kronik menjadi tantangan. Obat yang bekerja sebagai agonis GABA seperti gabapentin dan baclofen dilaporkan mempunyai peranan penting dalam penghambatan proses nyeri. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian gabapentin dan baclofen terhadap histologi dorsal horn pada keadaan nyeri kronik akibat inflamasi. Hal ini bertujuan untuk menjelaskan bagaimana gabapentin dan baclofen dapat digunakan sebagai terapi pada nyeri kronik. Empat puluh mencit dibagi menjadi delapan kelompok, yaitu sham, kontrol negatif, gabapentin dosis 10, 30 dan 100 nmol/mencit serta baclofen dosis 1, 10 dan 30 nmol/mencit. keadaan inflamasi diinduksi oleh injeksi intraplantar CFA (*Completed Freud's Adjuvants*). Gabapentin dan baclofen diberikan secara intratekal sehari sekali selama tujuh hari, pada hari ketujuh setelah induksi CFA. Waktu ketahanan terhadap stimulus panas diukur menggunakan *hot/cold plate* pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12 dan 14 setelah induksi. Tebal plantar diukur pada hari ke-0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 dan 14 setelah induksi. Respon nyeri diamati secara visual seperti mendekatkan kedua tungkai kaki ke depan, menjilat tungkai kaki ke depan, gerakan meliuk, berusaha melompat keluar *hot/cold plate*, dan menghentakkan tungkai belakang. Histologi bagian dorsal horn dari *spinal cord* diamati menggunakan pewarnaan haematoxylin-eosin. Pemberian gabapentin dan baclofen meningkatkan waktu ketahanan terhadap stimulus panas secara signifikan dibandingkan kontrol. Secara histologi, pemberian gabapentin dan baclofen menurunkan sel inflamatori, menurunkan vasodilatasi dan meningkatkan bentukan neuron pada *dorsal horn* dari *spinal cord* dibandingkan dengan kontrol. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian gabapentin dan baclofen meningkatkan waktu ketahanan terhadap stimulus panas serta memperbaiki histologi dorsal horn dari *spinal cord* mencit dengan nyeri inflamasi setelah induksi CFA.

Kata kunci : Nyeri inflamasi, CFA, Gabapentin, Baclofen, Dorsal horn

PENDAHULUAN

International Association for the Study of Pain (IASP) mendefinisikan nyeri sebagai pengalaman sensoris dan emosional tidak menyenangkan yang berhubungan dengan terjadinya kerusakan jaringan secara aktual maupun potensial^{1,2}. Pada umumnya, penyakit selalu disertai dengan terjadinya nyeri. Meskipun nyeri seringkali dianggap sederhana, namun tanpa terapi yang tepat akan mengarah pada terjadinya kondisi nyeri kronik dan berdampak pada penurunan kualitas hidup³.

Nyeri kronik merupakan satu dari gejala yang paling sering dilaporkan terjadi pada satu dari enam orang dalam populasi dan diperkirakan terjadi pada 2-40,0% populasi dewasa^{2,3}. Pada penduduk dengan usia lanjut di Indonesia, dilaporkan 25,0–50,0% diantaranya mengalami nyeri⁴. Nyeri kronik dihubungkan dengan fungsi mental dan sosial serta kemiskinan akibat kehilangan pekerjaan³. Penelitian di Amerika Serikat menyatakan bahwa biaya tahunan untuk nyeri kronik diperkirakan mencapai 100 miliar dolar⁵.

Terapi untuk mengatasi nyeri kronik sampai saat ini masih menjadi suatu tantangan di klinis. Morfin dan peptida opioid yang merupakan analgesik poten yang digunakan sebagai terapi utama untuk mengatasi nyeri kronik mempunyai banyak kelemahan diantaranya, adanya efek samping jangka panjang seperti masalah imunologi, ketergantungan fisik, *misuse* atau *abuse* sehingga menyebabkan pembatasan terhadap penggunaan morfin sebagai analgesik pada pasien dengan nyeri kronis⁶. Oleh sebab itu diperlukan strategi alternatif untuk mengatasi nyeri kronik, salah satunya adalah penggunaan analgesik *adjuvant* yang bekerja pada sistem *gamma aminobutyric acid* (GABA)-ergik, yaitu obat-obat agonis GABA seperti Gabapentin dan Baclofen⁷.

Pada keadaan normal terjadi keseimbangan antara fungsi GABA dengan glutamat, dalam hal ini NR2B. Hilangnya hambatan GABA berkontribusi dalam patofisiologi nyeri kronik, dimana terdapat ketidakseimbangan level GABA yang signifikan pada pasien nyeri kronik⁸. Pengamatan nyeri dilakukan pada bagian *dorsal horn* dari jaringan *spinal cord* yang merupakan pusat penghantaran nyeri dan daerah yang memperlihatkan ekspresi dari reseptor GABA dan NR2B paling banyak^{5,7}. Oleh sebab itu pada penelitian ini diharapkan dapat diketahui pengaruh pemberian Gabapentin dan Baclofen terhadap Histologi *Dorsal Horn* dari *Spinal Cord* Mencit yang mengalami Nyeri Kronik akibat inflamasi dengan induksi CFA.

Mencit sebagai model inflamasi diinduksi menggunakan *completed Freud's adjuvant* (CFA) pada kaki kanan (ipsilateral) secara intraplantar. Lipopolisakarida dari *Mycobacterium tuberculosis* yang inaktif dalam CFA bertanggung jawab atas terjadinya inflamasi pada hewan coba. Pemberian CFA akan menstimulasi fagositosis, sekresi sitokin oleh fagositosis mononuklear,

sehingga berbagai jenis sitokin seperti TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, PGE-2, NO, MMP dan mediator lainnya akan dilepaskan⁹.

Inflamasi oleh CFA menyebabkan proses transduksi sinyal yang diikuti pelepasan mediator inflamasi (seperti prostaglandin, bradikinin, histamin dan serotonin) sehingga terjadi aktivasi nosiseptor¹⁰. Proses ini kemudian diikuti oleh transmisi stimulus nyeri melalui serat saraf A δ dan C. Transmisi sinyal dari bagian *dorsal horn* dari *spinal cord* kemudian diteruskan ke otak. Proses ini akan menginduksi rilis neurotransmitter glutamat dan substansi P. Glutamat akan berikatan pada reseptor non NMDA (yaitu AMPA dan kainat), sedangkan substansi P akan berikatan dengan reseptor NK-1 sehingga menyebabkan depolarisasi *dorsal horn* dan aktivasi jalur pusat (*central pathway*)¹¹. Depolarisasi yang berlangsung terus menerus menyebabkan hilangnya penghambatan Mg²⁺ pada kanal reseptor NMDA sehingga menyebabkan masuknya Ca²⁺ dari ekstraseluler ke intraseluler dan terjadi peningkatan Ca²⁺ intraseluler¹². Ca²⁺ akan berikatan dengan *calcium calmodulin* (CaM) dan menstimulasi aktivasi dari *calcium-stimulated signaling pathways*⁵. Proses ini akan menyebabkan aktivasi dua jalur, yaitu: *adenylate cyclase* (AC) dan *protein kinase C* (PKC) dan menyebabkan fosforilasi dari NR2B dan memfasilitasi pelepasan asam amino eksitatori (glutamat) dan neuropeptida (substansi P), sebagai neurotransmitter penting dalam patofisiologi nyeri kronik^{11,13}. Pada morfologi dari *dorsal horn* akan ditandai dengan penampakan nucleolus yang menyolok diakibatkan peningkatan aktivitas neuron dalam melepaskan dan menerima neurotransmitter glutamat¹⁴.

BAHAN DAN METODE

Bahan : Gabapentin (Sigma), Baclofen (Sigma), *Complete Freud's*

Adjuvant p.a (Sigma), *normal saline* (Bratachem, p.a), *neutral buffered formalin* 10%p.a (Sigma), *hematoxylin-eosin* (Baxter), Eter p.a (E. Merck) dan alkohol 70% (Bratachem, p.a).

Alat : *Warm plate* 35100 (Ugo Basile), *syringe* (Hamilton) , jarum suntik 30G (BD PrecisionGlide™ Needle) dan 26G (Terumo), kandang mencit beserta tutupnya, mikroskop cahaya beserta kamera (Olympus CX 31), dan neraca analitik (Sartorius).

Hewan Uji : Mencit putih (*Mus musculus*) strain Balb-C yang diperoleh dari Laboratorium Hewan, Fakultas Farmasi Universitas -Airlangga, jenis kelamin jantan usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-25 gram sehat, dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh. Hewan coba diadaptasikan selama 1 minggu sebelum digunakan untuk percobaan. Penelitian ini dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan nomor *ethical clearance* 178-KE.

Induksi Nyeri Kronik Menggunakan CFA

Mencit dianastesi menggunakan eter kemudian ditempatkan pada papan bedah dengan posisi terlentang, dan diinduksi nyeri inflamasi dengan injeksi intraplantar *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) sebanyak 40 µl/mencit disuntikan kedalam ruang antara kulit dan otot secara hati-hati. Pada kelompok *Sham* diberikan perlakuan yang sama dengan injeksi *normal saline* sebagai pengganti CFA.

Pemberian Gabapentin dan Baclofen

Gabapentin dilarutkan dalam *normal saline* dan diberikan secara intratekal (it) dengan dosis 10, 30 dan 100 nmol/mencit sebanyak 5 µl. Sedangkan baclofen diberikan dengan dosis 1, 10 dan 30 nmol/ mencit sebanyak 5 µl. Injeksi it dilakukan mengikuti prosedur Hylden dan Wilcox (1980), yaitu :

jarum disisipkan pada ruang antar tulang belakang diantara lumbal 4 (L4) dan lumbal 5 (L5) dari *spinal cord*, bila jarum sudah masuk ke *column spinalis* dengan cepat ekor mencit akan menunjukkan gerakan *flick*.

Evaluasi Hiperalgnesia dan Respon Anti Nyeri

Pengujian waktu ketahanan terhadap stimulasi panas dilakukan menggunakan alat *hot/cold plate*. Mencit ditempatkan pada *hot/cold plate* diatur pada suhu $48 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Perilaku mencit kemudian diamati, bila mencit telah menunjukkan respon nyeri maka penghitung waktu dimatikan dan mencit segera dikeluarkan dari *hot/cold plate*. Evaluasi respon nyeri yang dilihat berdasarkan pengamatan visual terhadap beberapa perilaku seperti : mendekatkan kedua tungkai kaki ke depan, menjilat tungkai kaki ke depan, gerakan meliuk, berusaha melompat keluar *hot/cold plate*, dan menghentakkan tungkai belakang. Pengujian waktu ketahanan terhadap stimulus panas dilakukan pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, dan 14. Pengujian waktu ketahanan terhadap stimulus panas pada hari ke-0 digunakan sebagai data awal (*baseline*).

Evaluasi Tebal Plantar

Tebal plantar dievaluasi menggunakan jangka sorong. Tebal plantar diukur pada hari ke-0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 7, 8, 10, 12, dan 14 setelah injeksi intraplantar CFA dan *normal saline*. Pengukuran tebal plantar hari ke-0 merupakan tebal plantar sebelum diinjeksi menggunakan CFA dan digunakan sebagai data awal (*baseline*).

Pengamatan Histologi

Mencit yang akan diambil jaringannya dimatikan pada hari ke-15 dengan menggunakan eter dan hewan coba dibedah untuk mengambil jaringan *spinal cord*. Jaringan *spinal cord* yang telah diambil difiksasi dalam *neutral buffered formalin* (NBF) 10% dalam dapar fosfat dengan pH 7,4.

Pewarnaan menggunakan pereaksi *hematoxylin-eosin* pada jaringan *spinal cord*. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 40x dan 1000x. Pengamatan pada perbesaran 100x menggunakan minyak imersi dan diamati morfologi sel neuron dan infiltrasi dari sel inflamatori pada bagian *dorsal horn*. Hasil histologi dibandingkan antara kelompok perlakuan dengan kelompok *sham* dan kontrol negatif.

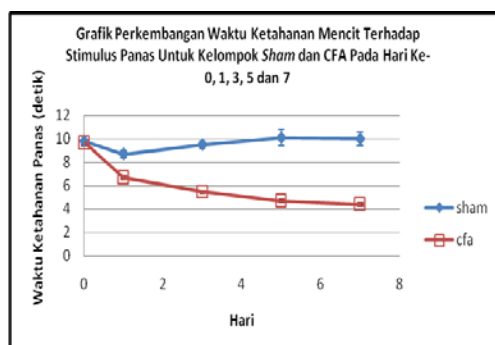
Analisis Data

Waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok *sham* dan kontrol negatif pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12 dan 14. Tebal plantar kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok *sham* dan kontrol negatif pada hari ke-0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 dan 14. Data yang

didapat dinyatakan dalam rerata \pm SEM. Data ditampilkan dalam bentuk kurva dan dianalisis menggunakan *independent t-test* dan *one way anova* dengan derajat kepercayaan 95%.

HASIL

Keberhasilan pembuatan model inflamasi berupa penurunan waktu ketahanan terhadap stimulus panas dan peningkatan tebal plantar yang menandakan terjadinya hiperalgesia dibandingkan dengan data awal pada hari ke-0 (gambar 1 dan tabel 1). Uji statistika menggunakan *independent t test* memperlihatkan waktu ketahanan panas yang tidak berbeda bermakna antara kelompok *Sham* dan CFA pada hari ke-0 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa hewan coba berada dalam kondisi awal yang sama. Setelah pem-



Gambar 1 Perkembangan Waktu Ketahanan Mencit Terhadap Stimulus Panas pada Kelompok *Sham* dan CFA Pada Hari Ke-0, 1, 3, 5 dan 7

Tabel 1 Tebal Plantar Mencit pada Kelompok *Sham* dan CFA Pada Hari Ke-0 sampai Hari Ke-7

No	Kelompok	Rerata Tebal Plantar Mencit Hari ke- (mm \pm SEM)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Sham</i>	2,25 \pm	2,37 \pm	2,45 \pm	2,25 \pm	2,27 \pm	2,28 \pm	2,24 \pm	2,27 \pm
	(n = 5)	0,04	0,09 ^{*)}	0,05 ^{*)}	0,06 ^{*)}	0,05 ^{*)}	0,03 ^{*)}	0,04 ^{*)}	0,04 ^{*)}
2	CFA	2,33 \pm	4,42 \pm	4,54 \pm	3,98 \pm	3,77 \pm	3,67 \pm	3,64 \pm	3,60 \pm
	(n = 35)	0,02	0,11 ^{*)}	0,11 ^{*)}	0,10 ^{*)}	0,08 ^{*)}	0,08 ^{*)}	0,06 ^{*)}	0,06 ^{*)}

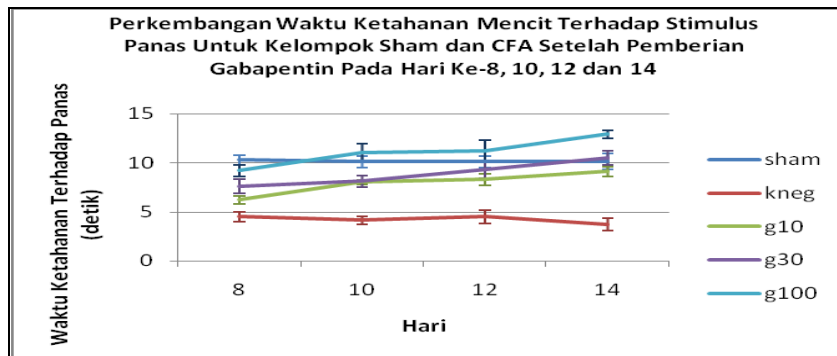
Keterangan :

Tanda ^{*)} menunjukkan rerata tebal plantar mencit yang berbeda bermakna antara kelompok *Sham* dan CFA pada hari ke-0 sampai 7 ($p < 0,001$; dengan *independent t test* pada interval kepercayaan 95%)

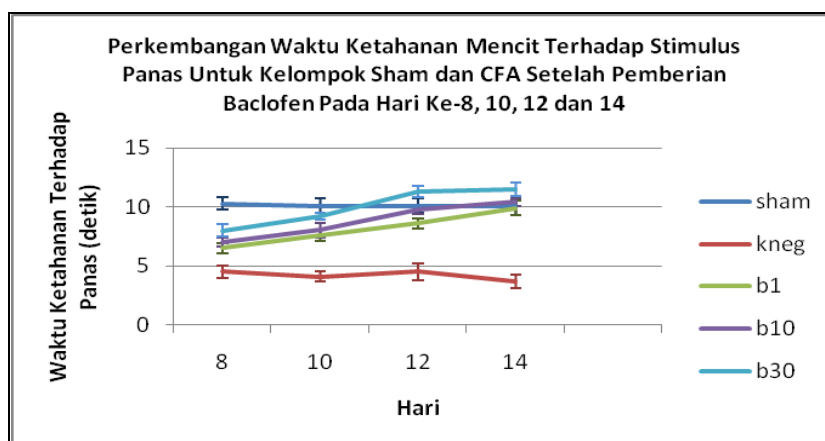
berian CFA, terlihat adanya penurunan waktu ketahanan panas yang bermakna pada kelompok CFA dibandingkan kelompok *Sham* pada hari ke 1, 3 dan 7 ($p < 0,001$) dan pada hari ke-5 ($p < 0,0001$), yang menandakan telah terjadi nyeri inflamasi pada kelompok CFA.

Pada hari ke-0 sampai hari ke-7, mencit pada kelompok CFA mengalami peningkatan tebal plantar dibandingkan dengan *baseline* pada hari ke-0 (Tabel 1). Uji statistika menggunakan *independent t test*

memperlihatkan tebal plantar pada kelompok *Sham* dan CFA pada hari ke-0 tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa hewan coba berada dalam kondisi awal yang sama. Peningkatan tebal plantar kelompok CFA berbeda secara bermakna dibandingkan kelompok *Sham* pada pada hari ke-1, 3, 5 dan 7 ($p < 0,001$). Hal ini menunjukkan bahwa setelah injeksi CFA, kelompok CFA telah mengalami nyeri inflamasi.



Gambar 2 Waktu Ketahanan Mencit terhadap Stimulus Panas pada Kelompok *Sham* dan CFA Setelah Pemberian Gabapentin dengan dosis 10 nmol (g10), 30 nmol (g30) dan 100 nmol (g1000) Pada Hari Ke-8, 10, 12 dan 14



Gambar 3 Waktu Ketahanan Mencit terhadap Stimulus Panas pada Kelompok *Sham* dan CFA Setelah Pemberian Baclofen dosis 1 nmol (b1), 10 nmol (b10) dan 30 nmol (b30) Pada Hari Ke-8, 10, 12 dan 14

Gambar 2 dan 3 menjelaskan bahwa pemberian gabapentin dan baclofen dapat memperbaiki kondisi hiperalgesia pada mencit yang diinduksi CFA, ditandai dengan peningkatan waktu ketahanan terhadap stimulasi panas. Analisis statistik dengan metode *one way anova* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan yang diinjeksi intratekal gabapentin dan baclofen dengan kelompok yang mengalami nyeri inflamasi ($p < 0,05$). Semua kelompok perlakuan pada hari ke-12 menunjukkan peningkatan waktu ketahanan terhadap stimulus panas yang tidak berbeda

bermakna dengan kelompok *Sham* ($p > 0,05$). Pada kelompok *Sham*, waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas tetap berada pada nilai *baseline*, dimana hal ini menunjukkan bahwa injeksi intratekal *normal saline* tidak memberikan pengaruh terhadap waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif, waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas semakin menurun. Hal ini disebabkan pada kelompok kontrol negatif tidak mendapatkan terapi obat untuk mengatasi nyeri kronik. Waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas pada hari

Tabel 2 Pengaruh Pemberian Gabapentin dan Baclofen Terhadap Waktu Ketahanan Panas Pada Hari ke-14

Kelompok	Perlakuan	Rerata Waktu Ketahanan Panas pada Hari ke-14 (detik \pm SEM)
<i>Sham</i> (n = 5)	<i>Normal saline</i>	10,2 \pm 0,8 ^{a)}
	<i>Normal saline</i>	3,7 \pm 0,6 ^{b)}
CFA (n = 35)	Gabapentin 10 nmol	9,1 \pm 0,5 ^{a)}
	Gabapentin 30 nmol	10,5 \pm 0,7 ^{a)}
	Gabapentin 100 nmol	12,9 \pm 0,4 ^{c)}
	Baclofen 1 nmol	9,9 \pm 0,6 ^{a)}
	Baclofen 10 nmol	10,4 \pm 0,3 ^{a)}
	Baclofen 30 nmol	11,5 \pm 0,6 ^{a)}

Keterangan :

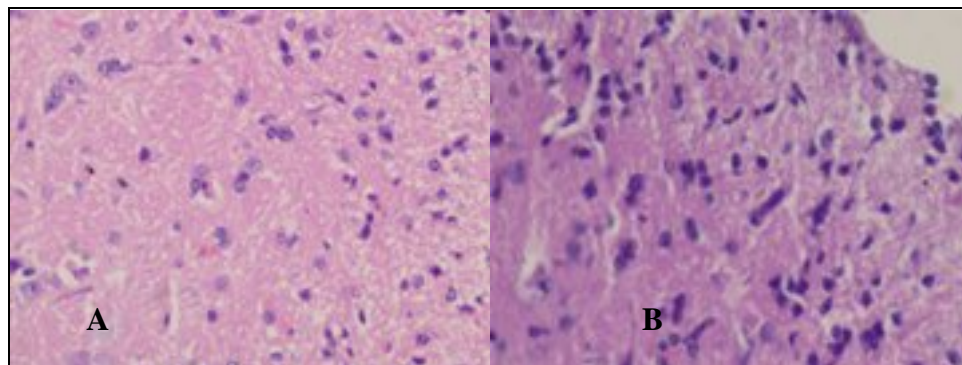
Huruf yang berbeda memperlihatkan rerata tebal plantar yang berbeda bermakna pada tiap kelompok di masing-masing hari menggunakan *one way anova* dengan *Tukey HSD* ($p < 0,05$; interval kepercayaan 95%)

Tabel 3 Pengaruh Pemberian Gabapentin dan Baclofen Terhadap Tebal Plantar Mencit Pada Kelompok *Sham* dan CFA

Kelompok	Perlakuan	Rerata Tebal Plantar Mencit pada Hari ke- (mm \pm SEM)			
		8	10	12	14
<i>Sham</i> (n = 5)	<i>Normal saline</i>	2,35 \pm 0,04 ^{a)}	2,35 \pm 0,04 ^{a)}	2,36 \pm 0,04 ^{a)}	2,40 \pm 0,07 ^{a)}
	<i>Normal saline</i>	3,77 \pm 0,2 ^{b)}	3,70 \pm 0,21 ^{b)}	3,53 \pm 0,17 ^{b)}	3,50 \pm 0,16 ^{b)}
CFA (n = 35)	Gabapentin 10 nmol	3,52 \pm 0,15 ^{b)}	3,48 \pm 0,13 ^{b)}	3,33 \pm 0,15 ^{b)}	3,30 \pm 0,15 ^{b)}
	Gabapentin 30 nmol	3,45 \pm 0,14 ^{b)}	3,40 \pm 0,14 ^{b)}	3,32 \pm 0,13 ^{b)}	3,13 \pm 0,14 ^{b)}
	Gabapentin 100 nmol	3,43 \pm 0,06 ^{b)}	3,36 \pm 0,07 ^{b)}	3,26 \pm 0,06 ^{b)}	3,11 \pm 0,04 ^{b)}
	Baclofen 1 nmol	3,63 \pm 0,09 ^{b)}	3,57 \pm 0,08 ^{b)}	3,48 \pm 0,08 ^{b)}	3,38 \pm 0,08 ^{b)}
	Baclofen 10 nmol	3,51 \pm 0,19 ^{b)}	3,39 \pm 0,15 ^{b)}	3,24 \pm 0,12 ^{b)}	3,13 \pm 0,11 ^{b)}
	Baclofen 30 nmol	3,46 \pm 0,17 ^{b)}	3,34 \pm 0,15 ^{b)}	3,24 \pm 0,15 ^{b)}	3,13 \pm 0,13 ^{b)}

Keterangan :

Huruf yang berbeda memperlihatkan rerata tebal plantar yang berbeda bermakna pada tiap kelompok di masing-masing hari menggunakan *one way anova* dengan *Tukey HSD* ($p < 0,05$; interval kepercayaan 95%)



Gambar 4 Irisan Melintang *Dorsal Horn* dari *Spinal Cord* Mencit Kelompok *Sham* (A) dan Kelompok CFA (B) menggunakan Pewarnaan *Haematoxylin Eosin* perbesaran 400 kali.

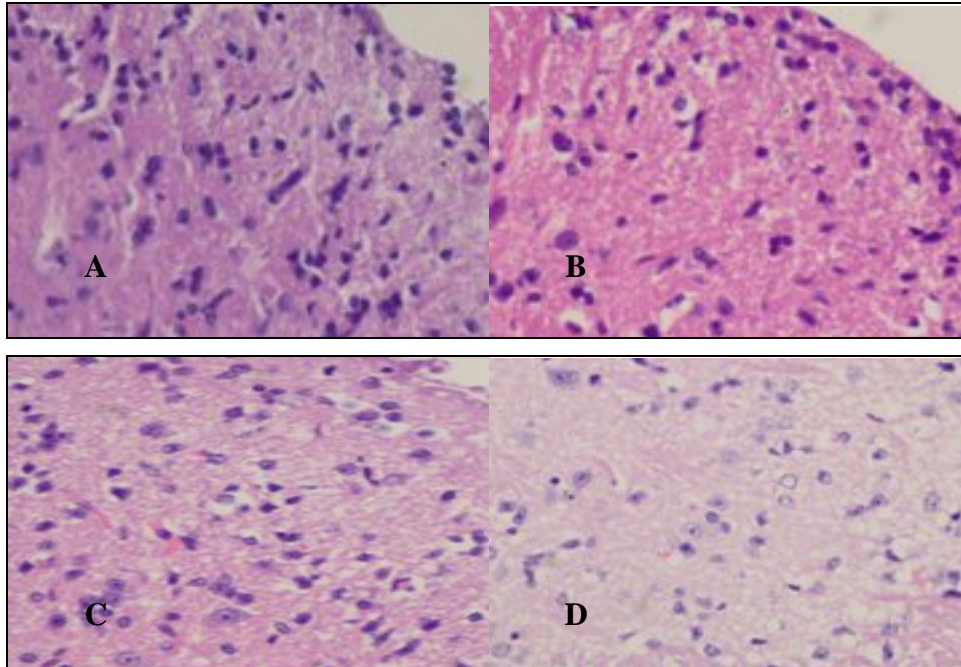
ke-14 pada kelompok gabapentin dengan dosis terkecil 10 nmol/mencit dan kelompok baclofen dengan dosis terkecil 1 nmol/mencit tidak berbeda bermakna antara kelompok *sham* yang merupakan kelompok kontrol.

Parameter yang juga diukur selain waktu ketahanan terhadap stimulus panas adalah ketebalan plantar mencit. Tabel 3 memperlihatkan adanya perbaikan pada kondisi nyeri inflamasi pada mencit yang ditandai dengan penurunan tebal plantar. Hasil analisis statistik dengan *one way anova* menunjukkan pemberian injeksi intratekal gabapentin dan baclofen untuk semua dosis tidak menyebabkan penurunan tebal plantar yang bermakna jika dibandingkan dengan kelompok yang mengalami inflamasi ($p > 0,05$).

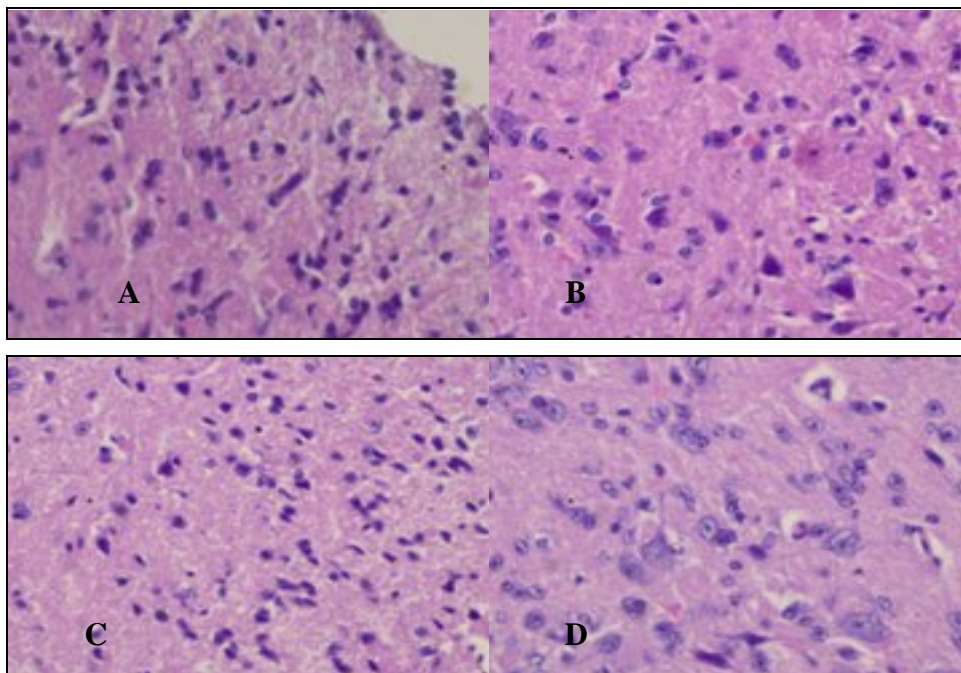
Terjadinya nyeri kronik akibat adanya inflamasi dapat dilihat dari terjadinya perubahan pada morfologi jaringan *spinal cord* yang diwarnai dengan *hematoxylin-eosin* dan diamati menggunakan mikroskop. Dari Gambar 4 terlihat adanya perbedaan morfologi jaringan *spinal cord* pada bagian *dorsal horn* antara kelompok *Sham* dan kelompok CFA. Pada Kelompok *Sham* (A) merupakan

kelompok kontrol memperlihatkan sedikit sel inflamatori dan dijumpai bentukan neuron dengan keadaan nukleolus yang tidak menonjol (*prominent*). Hal ini berkebalikan dengan kelompok CFA (B), dimana inflamasi akibat induksi CFA memperlihatkan perubahan morfologi pada *dorsal horn* seperti semakin banyaknya sel inflamatori, terjadi vasodilatasi pembuluh darah dan hampir tidak dijumpainya bentukan neuron.

Pengaruh pemberian gabapentin dan baclofen selama tujuh hari terhadap nyeri inflamasi memperlihatkan perbaikan morfologi jaringan *spinal cord* pada bagian *dorsal horn* seperti yang terlihat pada Gambar 5. Kelompok dengan pemberian gabapentin dosis 30 nmol/mencit (C) dan 100 nmol/mencit (D) memperlihatkan morfologi yang lebih baik, dimana terdapat lebih sedikit infiltrasi sel inflamatori dan terjadi peningkatan bentukan neuron dengan nukleolus yang tidak menonjol (*prominent*) pada bagian *dorsal horn* mencit. Seperti halnya pada pemberian gabapentin, pemberian baclofen juga memperlihatkan adanya perbaikan pada morfologi *dorsal horn* dari *spinal cord*.



Gambar 5 Irisan Melintang Bagian *Dorsal Horn* dari *Spinal Cord* Mencit dengan Nyeri Inflamasi menggunakan Pewarnaan *Haematoxylin Eosin* pada Kelompok CFA (A) dan Kelompok Perlakuan Gabapentin 10 nmol/mencit (B), Gabapentin 30 nmol/mencit (C) dan Gabapentin 100 nmol/mencit (D) dengan Perbesaran 400 kali.



Gambar 6 Irisan Melintang Bagian *Dorsal Horn* dari *Spinal Cord* Mencit dengan Nyeri Inflamasi Menggunakan Pewarnaan *Haematoxylin Eosin* pada Kelompok CFA (A) dan Kelompok Perlakuan Baclofen 1 nmol/mencit (B), Baclofen 10 nmol/mencit (C) dan Baclofen 30 nmol/mencit dengan Perbesaran 400 kali.

Pada Gambar 6 memperlihatkan, bagian *dorsal horn* mencit dari kelompok yang mendapatkan injeksi baclofen dosis 1 nmol/mencit dan 10 nmol/mencit mulai terdapat bentukan neuron dengan keadaan nukleolus yang tidak dapat dibedakan dengan nukleus, yang tidak dijumpai pada kelompok CFA. Pada kelompok yang mendapatkan baclofen dosis 30 nmol (D) memperlihatkan morfologi yang lebih baik, dimana infiltrasi sel inflamatori mulai berkurang dan terlihat adanya peningkatan bentukan neuron pada bagian *dorsal horn* mencit.

PEMBAHASAN

Inflamasi oleh CFA pada awalnya akan menyebabkan kerusakan pada akson sehingga menyebabkan kematian pada neuron dan merangsang aktivasi dari sel inflamatori¹⁵. Keadaan ini akan menyebabkan penurunan dari neuron dan peningkatan infiltrasi dari sel inflamatori seperti yang terlihat pada pewarnaan HE. Selain itu keadaan inflamasi akan menstimulasi pembentukan prostaglandin (PGE_2) sebagai hasil aktivasi fosfolipase A_2 . Pembentukan PGE_2 akan menyebabkan vasodilatasi pada pembuluh darah, sehingga terjadi peningkatan permeabilitas pembuluh darah¹⁴. Vasodilatasi pembuluh darah akan mengaktifasi infiltrasi dari sel inflamatori intrinsik (mikroglia) dan ekstrinsik (neutrofil, makrofag, limfosit, *NK cell*) sehingga terjadi peningkatan jumlah sel inflamatori¹⁵. Sel-sel inflamatori ini melepaskan berbagai sitokin seperti *interleukin* (IL)-1, IL-6, IL-10, *interferon* (INF)- γ , *transforming growth factor* (TGF)- β 1, dan *tumor necrosis factor* (TNF)- α . Selain itu *Reactive Oxygen Species* (ROS), enzim oksidatif dan *metalloproteinase* yang ikut bertanggung jawab pada

kerusakan sekunder seperti nekrosis dan apoptosis dari neuron^{16,17}. Disamping itu, kematian sel glia (dalam hal ini astrosit dan oligodendrosit), yang merupakan sel pendukung neuron juga berhubungan dengan kematian neuron sehingga terjadi penurunan pada jumlah neuron.

Pemberian gabapentin dan baclofen meningkatkan waktu ketahanan terhadap stimulus panas dan memperbaiki morfologi *dorsal horn* dari *spinal cord*, mengingat gabapentin dan baclofen merupakan senyawa agonis GABA yang bekerja mengaktifasi GABA dengan dua mekanisme yang berbeda. Mekanisme kerja dari Gabapentin diduga berhubungan dengan pengikatan pada subunit $\alpha_2\delta_1$ pada kanal Ca^{2+} yang teraktivasi voltase menyebabkan terjadinya hiperpolarisasi dan mempengaruhi rilis neurotransmitter GABA pada presinaps^{18,19}. Peningkatan rilis neurotransmitter GABA menyebabkan hambatan pada rilis neurotransmitter eksitatori di *dorsal horn* pada *spinal cord*, diantaranya glutamat dan substansi P dan menyebabkan hambatan masuknya Ca^{2+} dari ekstraseluler ke intraseluler sehingga tidak terjadi peningkatan Ca^{2+} intraseluler sehingga terjadi penurunan aktivitas NR2B dan sensitiasi nyeri^{20,21,22}.

Baclofen merupakan agonis reseptor GABA_B , yang berikatan langsung pada reseptor GABA_B di postsinaps²³. Hal ini akan menyebabkan hambatan aktivitas *adenylate cyclase* (AC) untuk memproduksi cAMP. Penurunan cAMP akan menghambat kanal Ca^{2+} sehingga mencegah masuknya Ca^{2+} ke intraseluler. Aktivasi pada GABA_B juga menstimulasi pembukaan kanal K^+ pada postsinaps melalui subunit $\text{G}_{\beta\gamma}$, menyebabkan hiperpolarisasi pada postsinaps. Penurunan Ca^{2+} dan peningkatan K^+ pada intraseluler memperantari

hambatan pengeluaran neuro-transmitter glutamat sehingga menyebabkan penurunan aktivitas NR2B dan sensitisasi nyeri²³.

KESIMPULAN

Pemberian gabapentin dengan dosis 10 nmol/mencit dan baclofen dosis 1 nmol/mencit dapat meningkatkan waktu ketahanan terhadap stimulus panas setara dengan kelompok kontrol pada hari ke-14 terapi dan memperbaiki histologi *dorsal horn* dari *spinal cord* pada mencit yang mengalami nyeri inflamasi dengan induksi CFA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Fakultas Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga serta Fakultas Farmasi Universitas Jember atas sarana dan prasarana yang menunjang penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. International Association for the Study of Pain (IASP). IASP Taxonomy. 2011; <http://www.iasp-pain.org> [diakses tanggal 15 Oktober 2011]
2. Xie, W. Assessment of Pain in Animals *In* Ma, C., and Zhang, J.M. (Eds). *Animal Models of Pain*. New York : Humana Press; 2011; p. 23-76.
3. Mallen, C., Peat, G., Thomas, E., Croft, P. Severely Disabling Chronic Pain in Young Adults : Prevalence from a Population-based Postal Survey in North Staffordshire, *BMC Musculoskeletal Disorders* 2005; 42(6) : 1-9.
4. Kartini. Hubungan Nyeri dengan Gangguan Aktivitas Interpersonal pada Individu Usia 50 Tahun Keatas di Kabupaten Purworejo. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada; 2007.
5. Zhuo, M., Wu, G., Wu, L.J. Neuronal and Microglial Mechanism of Neuropathic Pain (Review). *Molecular Brain* 2011; 31(4) : 1-12.
6. Baron, R., Binder, A., Wasner, G. Neuropathic Pain : Diagnosis, Pathophysiological Mechanisms, and Treatment. *The Lancet Neurology* 2010; 9 : 807-819.
7. Wang, X.L., Zhang, H.M., Chen, S.R., Pan, H.L. Altered Synaptic Input and GABAB Receptor Function in Spinal Superficial Dorsal Horn Neurons in Rats with Diabetic Neuropathy. *Journal of Physiology* 2007; 579(3) : 849-861.
8. Miletic, G., Draganic, P., Pankratz, M.T., Miletic, V. Muscimol Prevents Long-Lasting Potentiation of Dorsal Horn Field Potentials in Rats with Chronic Constriction Injury exhibiting Decreased Levels of the GABA Transporter GAT-1. *Pain* 2003; 105 : 347-353.
9. Calder, P.C. N 3 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Inflammatory Diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 83(suppl) : 1505S-1519S.
10. Woolf, C. J. Pain : Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of Internal Medicine* 2004; 140 : 441-451.
11. Petrenko, A.B., Yakamura, T., Baba, H., Shimoji, K. The Role of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor in Pain : A Review. *Anesthesia & Analgesia* 2003; 97 : 1108-1116.
12. Riley, J. and Boulis, N.M. Molecular Mechanism of Pain : A Basis for Chronic Pain and Therapeutic Approaches Based on The Cell and the Gene. *Clinical Neurosurgery* 2006; 53(1) : 77-97.
13. Hudspeth, M.J., Siddall, P.J., Munglani, R. Physiology of Pain, *In* Hemmings, H.C., and Hopkins, P.M. (Eds), *Foundations of Anesthesia : Basic Science and Clinical Practise*, 2nd Edition, London : Mosby Elsevier Ltd; 2006. p. 267-285.
14. Khotib, J., Gondo, L., Aji, R., Zulkarnain, B.S. Pengaruh Pemberian Antagonis Reseptor N-Metil-D-Aspartat (NMDA) MK-801 Terhadap Penurunan Sensasi Nyeri Inflamasi. *Majalah Farmasi Airlangga* 2009; 7(1) : 28-35.
15. Benke, D., Zemoura, K., Maier, P.J. Modulation of cell surface GABAB Receptors by Desensitization, Trafficking and Regulated Degradation, *World Journal of Biological Chemistry* 2012; 3(4) : 61-72.
16. Chan, C.C.M., 2008. Inflammation : Beneficial or Detrimental After Spinal Cord Injury?, *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 3(3) : 189-199.
17. Mautes, A.E.M., Weinzierl, M.R., Donovan, F., and Noble, L.J., 2000. Vascular Events After

- Spinal Cord Injury : Contribution to Secondary Pathogenesis, *Physical Therapy*, 80(7) : 673-687.
18. Bee, L.A., and Dickenson, A.H. Neuropathic Pain : Multiple Mechanism at Multiple Sites, *Future Neurology* 2007; 2(6) : 661-671.
 19. Hahm, T.S., Ahn, H.J., Bae, C.D., Kim, H.S., Lim, S.W., Cho, H.S., et al. Protective Effects of Gabapentin on Allodynia and $\alpha\delta$ -Subunit of Voltage-dependent Calcium Channel in Spinal Nerve-Ligated Rats. *Journal of Korean Medical Science* 2009; 24 : 146-151.
 20. Laughlin, T.M., Tram, K.V., Wilcox, G.L., Birnbaum, A.K. Comparison of Antiepileptic Drugs Tiagabine, Lamotrigine, and Gabapentin in Mouse Models of Acute, Prolonged and Chronic Nociception. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 302(2) : 1168-1175
 21. Olsen, R.W. GABA, *In* Davis, K.L., Charney, D., Coyle, J.T., and Nemeroff, C. (Eds), *Neuropsychopharmacology : The Fifth Generation of Progress*, Philadelphia : Lippincott William & Wilkins; 2002; p. 159-167.
 22. Urban, M.O., Ren, K., Park, K.T., Campbell, B., Anker, N., Stearns, B., et al. Comparison of the Antinociceptive Profiles of Gabapentin and 3-Methylgabapentin in Rats Models of Acute and Persistent Pain : Implications for Mechanism of Action. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005; 313(3) : 1209-1216.
 23. Franek, M., Vaculin, S., Rokyta, R. GABA_B Receptor Agonist Baclofen Has Non-Specific Antinociceptive Effect in the Model of Peripheral Neuropathy in the Rats. *Physiological Research* 2004; 53 : 351-355.